

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° d'publication : 2 596 064
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : 86 03829

⑤1 Int Cl⁴ : C 12 P 21/00, 1/04; A 61 K 39/02, 39/116;
C 07 K 15/04, 15/14 // (C 12 P 21/00, C 12 R 1:22)
(C 12 R 1/15, 1:425).

①2

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 18 mars 1986.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 39 du 25 septembre 1987.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

⑦1 Demandeur(s) : PIERRE FABRE MEDICAMENT. — FR.

⑦2 Inventeur(s) : Lucien Dussourd d'Hinterland, Gérard Nor-
mier, Anne-Marie Pinel et Jacques Durand.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : Cabinet Regimbeau, Corre, Martin,
Schrimpf, Warcoïn et Ahner.

⑤4 Procédés industriels de fabrication de vaccins ribosomaux et vaccins ribosomaux obtenus.

⑤7 L'invention concerne un procédé de préparation de pro-
téoglycanes membranaires de bactéries choisies parmi : Kleb-
siella, Serratia et Corynebacterium, caractérisé en ce que, à
partir d'un lysat clarifié de ladite souche bactérienne,

a) on traite le surnageant du lysat clarifié avec le cetyltrimé-
thylammonium ou de l'acide trichloroacétique, et

b) après traitement, on sépare le surnageant contenant les
protéoglycanes membranaires purifiés des impuretés précipi-
tées.

PTO 2003-5358

S.T.I.C. Translations Branch

FR 2 596 064 - A1

La présente invention concerne les procédés industriels de fabrication de vaccins ribosomaux et les vaccins ribosomaux qui en dérivent.

5 Les vaccins ribosomaux sont des vaccins dans lesquels la fraction antigénique est constituée par une fraction ribosomale, cette fraction ribosomale antigénique doit en général être adjuvée par une fraction qui peut être d'origine microbienne également, il s'agit la plupart du temps de glycoprotéines d'origine membranaire et/ou des
10 polyssacharides ou lipopolysaccharides d'origine microbienne.

Le brevet antérieur de la demanderesse, n° 73 43957 du 10 décembre 1973, décrivait la préparation de vaccins à base de fractions ribosomales antigéniques adjuvées par une fraction membranaire de *Klebsiella pneumoniae*.
15

Les brevets antérieurs de la demanderesse n° 75 10252 du 2 avril 1975 et 76 24124 du 6 août 1976 décrivaient des vaccins dérivés des vaccins ribosomaux

où l'ARN ribosomal ou bien les ribosomes eux-mêmes se trouvaient associés à des fractions polysaccharidiques ou lipopolysaccharidiques homologues et/ou hétérologues.

5 Le brevet antérieur de la demanderesse n° 78 35649 du 19 décembre 1978 décrivait la préparation de protéoglycanes membranaires bactériens utilisables notamment comme adjuvants dans les vaccins ribosomaux.

10 La présente invention, réalisée au Centre d'Immunologie et de Biologie Pierre FABRE, concerne de nouveaux procédés industriels pour la fabrication de fractions ribosomales microbiennes immunogéniques ainsi que des protéoglycanes membranaires de *Klebsiella pneumoniae* biotype a non capsulé qui leur sont associés comme adjuvants.

15 Cette nouvelle technologie permet le développement d'une production à très grande échelle de ce type de vaccins, notamment pour des applications vétérinaires telles que celles citées à titre d'exemple.

20 Plus particulièrement, la présente invention concerne un procédé de préparation de protéoglycanes membranaires de bactéries choisies parmi : *Klebsiella*, *Serratia* et *Corynebacterium*, caractérisé en ce que, à partir d'un lysat clarifié de ladite souche bactérienne,

a) on traite le surnageant du lysat clarifié avec le CTAB ou de l'acide trichloroacétique, et

25 b) après traitement, on sépare le surnageant contenant les protéoglycanes membranaires purifiés des impuretés précipitées.

30 De façon générale, le lysat de bactéries est obtenu par broyage d'un concentrat bactérien à l'aide de moyens mécaniques et/ou pneumatiques, ces moyens de broyage devront, bien entendu, être adaptés au type de

cellules microbiennes à désintégrer et des informations plus spécifiques seront données dans le cadre de la description des exemples.

5 Les lysats bactériens obtenus après broyage peuvent être clarifiés par toute technologie connue, mais seront de préférence clarifiés par centrifugation, par exemple, à 15 000 g, sur un séparateur, ceci pour éliminer les résidus de broyage et les germes non broyés.

10 Suivant le type de traitement effectué à l'étape a), on opère de la façon suivante :

- Lorsque l'on effectue le traitement au CTAB, on sépare le surnageant par centrifugation et on effectue une ultracentrifugation pour éliminer le CTAB lui-même, les sels et les contaminants de faible poids moléculaire, 15 ceci en utilisant, par exemple, une ultrafiltration tangentielle avec une membrane coupant à 10 000 d ;

- dans le cas où le traitement est un traitement à l'acide trichloroacétique, le précipité d'impuretés est éliminé par centrifugation, par exemple sur séparateur, et 20 le surnageant est ultrafiltré sur une membrane coupant à 10 000 d comme précédemment, mais après avoir de préférence ramené le pH au voisinage de 7, par exemple à 7,8, par addition d'une base telle que NaOH concentré.

25 Dans les deux cas, après ultrafiltration, on obtient une suspension concentrée de protéoglycanes membranaires, lesquels peuvent être stérilisés, par exemple par autoclavage à 120°C, puis lyophilisés pour être utilisés ultérieurement.

30 De façon préférentielle, les protéoglycanes membranaires adjuvants seront préparés à partir d'une souche de *Klebsiella pneumoniae* mutant, non capsulé, de biotype a, déposée à la Collection de l'Institut Pasteur de Paris sous le n° 145-I.IP.

La fraction ribosomale antigénique est préparée, de préférence, de la façon suivante :

a) On traite un lysat clarifié, filtré, de ladite souche par $MgCl_2$, par un acide organique ou par le CTAB ;

5 b) après traitement, on récupère le précipité qui est éventuellement lavé pour récupérer les ribosomes.

Le lysat clarifié, filtré, peut être obtenu pour le lysat clarifié comme cela a été décrit précédemment pour les protéoglycanes membranaires, toutefois le lysat clarifié
10 est filtré, de préférence par ultrafiltration sur une membrane coupant à $0,22 \mu$, ceci pour éliminer en particulier les protéoglycanes membranaires et les différents résidus de broyage qui n'auraient pas été éliminés lors de la centrifugation.

15 Selon la nature du traitement de l'étape a), on opère de préférence de la façon suivante :

- Lorsque le traitement est effectué avec $MgCl_2$, on ajoute au lysat bactérien clarifié et filtré une solution de $MgCl_2$, de préférence 1 N, jusqu'à obtenir une concentration
20 finale de 0,1 M en $MgCl_2$. On ajuste le pH à un pH acide, par exemple de l'ordre de 6, à l'aide de HCl dilué, et on laisse précipiter les ribosomes. Ce précipité est alors recueilli par exemple par centrifugation.

- Lorsque le traitement est effectué par un acide
25 organique, il s'agit plus particulièrement d'un traitement à l'acide acétique, on ajoute l'acide acétique jusqu'à un pH de 4 puis on laisse le précipité de ribosomes se former et on le sépare par exemple par centrifugation.

- Lorsque le traitement est un traitement au
30 CTAB, on ajoute au lysat bactérien clarifié et filtré une solution de CTAB, par exemple à 5 % (p/v), et on laisse le précipité se former. Ce précipité est récupéré par centrifugation et peut être lavé, par exemple à l'éthanol.

Le produit obtenu à la fin de l'étape b) constitue une fraction ribosomale brute qui peut être purifiée par lavage avec du dodécylsulfate de sodium, puis précipitation par exemple à l'alcool éthylique. Le précipité obtenu peut être soumis à une purification supplémentaire par chromatographie d'immuno-affinité sur colonne d'anticorps monoclonaux immobilisés, spécifiques du déterminant antigénique vaccinant lié aux ribosomes. Les ribosomes hautement purifiés ainsi obtenus peuvent être dialysés pour éliminer les excédents de sels puis stérilisés avant d'être utilisés en association avec les protéoglycanes membranaires.

La nature des souches traitées pour obtenir les ribosomes dépend bien entendu du type de vaccins que l'on souhaite obtenir puisque ces ribosomes constituent la fraction antigénique des vaccins.

On donnera ci-après différentes formules de vaccins qui entrent plus particulièrement dans le cadre de la présente invention. De façon générale les souches mises en oeuvre proviennent, soit de prélèvements pathologiques, soit de collections de microorganismes, ces souches ont été réactivées par passage sur animaux de laboratoire et entretenues sur des milieux appropriés.

Parmi les vaccins qui peuvent être obtenus grâce au procédé selon la présente invention, il faut citer plus particulièrement :

1) Vaccin contre les parodontopathies

- Formule unitaire

a)	Ribosomes d' <i>Actinomyces viscosus</i>	3 µg
	Ribosomes d' <i>Actinomyces naeslundii</i>	2 µg
	Ribosomes de <i>Veillonella parvula</i>	2 µg
	Protéoglycanes membranaires de <i>Klebsiella pneumoniae</i> biotype a	15 µg

2) Vaccin intestinal- Formule unitaire

	b) . Ribosomes d' <i>Escherichia coli</i>	3 µg
	. Ribosomes de <i>Salmonella typhimurium</i>	3 µg
5	. Ribosomes de <i>Shigella dysenteriae</i>	3 µg
	. Ribosomes de <i>Staphylococcus aureus</i>	3 µg
	. Protéoglycanes membranaires de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	18 µg

3) Vaccin contre les Candidoses- Formule unitaire

10	c) . Ribosomes de <i>Candida albicans</i> type A	3,5 µg
	. Ribosomes de <i>Candida albicans</i> type B	3,5 µg
	. Protéoglycanes membranaires de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	15,0 µg

4) Vaccin contre la méningite- Formule unitaire

15	d) . Ribosomes de <i>Neisseria meningitidis</i> groupe A	3,5 µg
	. Ribosomes de <i>Neisseria meningitidis</i> groupe C	3,5 µg
	. Protéoglycanes membranaires de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	15,0 µg

- Formule unitaire

	e) . Ribosomes d' <i>Haemophilus influenzae</i> type a	3,5 µg
20	. Ribosomes d' <i>Haemophilus influenzae</i> type b	3,5 µg
	. Protéoglycanes membranaires de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	15,0 µg

5) Vaccin pneumococcique- Formule unitaire

	f) . Ribosomes de <i>Streptococcus pneumoniae</i> type 1	3 µg
25	. Ribosomes de <i>Streptococcus pneumoniae</i> type 2	3 µg
	. Ribosomes de <i>Streptococcus pneumoniae</i> type 4	3 µg
	. Ribosomes de <i>Streptococcus pneumoniae</i> type 19 ...	3 µg
	. Protéoglycanes membranaires de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	20 µg

6) Vaccin Streptococcique trivalent contre la méningite du porc- formule unitaire

- 5 g) . Ribosomes de Streptococcus pyogenes groupe L 5 µg
 . Ribosomes de Streptococcus pyogenes groupe C 5 µg
 . Ribosomes de Streptococcus suis 5 µg
 . Protéoglycanes membranaires de Klebsiella pneumoniae biotype a 10 µg

7) Vaccin contre la staphylococcie du lapin- formule unitaire vaccin trivalent

- 10 h) . Ribosomes de Staphylococcus epidermidis 1,5 µg
 . Ribosomes de Staphylococcus aureus type 7 1,5 µg
 . Ribosomes de Staphylococcus aureus 1,5 µg
 . Protéoglycanes membranaires de Klebsiella pneumoniae biotype a 7,5 µg

- formule unitaire vaccin divalent

- 15 i) . Ribosomes de Staphylococcus (souche Mérieux) 3,5 µg
 . Ribosomes de Staphylococcus aureus 3,5 µg
 . Protéoglycanes membranaires de Klebsiella pneumoniae biotype a 15,0 µg

8) Vaccin contre la mammite de la vache- Formule unitaire

- 20 j) . Ribosomes de Staphylococcus aureus 5 µg
 . Ribosomes de Staphylococcus uberis 5 µg
 . Ribosomes de Streptococcus dysgalactiae 5 µg
 . Protéoglycanes membranaires de Klebsiella pneumoniae biotype a 20 µg

25 Ces vaccins sont obtenus par mélange des protéoglycanes membranaires obtenus précédemment et des ribosomes obtenus par les procédés décrits, les rapports en poids entre les ribosomes et les protéoglycanes membranaires étant de préférence compris entre 1/1 et 1/3 comptés pour l'ensemble de la fraction ribosomale par rapport à la fraction protéoglycane membranaire.

Les exemples ci-après sont plus particulièrement destinés à mettre en évidence d'autres caractéristiques et avantages de la présente invention.

EXEMPLE 1 - OBTENTION DE LYSATS CLARIFIES BACTERIENS

5 Cet exemple décrit le procédé préféré de préparation des lysats bactériens clarifiés, que ceux-ci soient destinés à être utilisés pour la préparation de protéoglycanes membranaires ou pour la préparation de fractions ribosomales, ceci explique pourquoi il n'est pas fait mention explicitement
10 de souches de microorganismes.

Les biomasses microbiennes sont obtenues par culture en fermenteur en milieu liquide dans des conditions classiques. La seule contrainte spécifique étant l'arrêt brusque de la croissance par refroidissement à + 4°C en fin
15 de phase exponentielle de croissance pour préserver l'intégrité des structures biologiques.

La biomasse est séparée du milieu de culture par centrifugation continue à froid sur des séparateurs industriels de type Sharples ou Westfalia.

20 Après lavage par remise en suspension dans du sérum physiologique stérile et centrifugation, les concentrats cellulaires sont stockés congelés en attendant d'être traités.

Le concentrat bactérien est décongelé dans un réacteur et mis en suspension dans du tampon tris-HCl (10 mM),
25 pH 7,0, contenant $MgCl_2$ (0,15 M) à 4°C pour avoir une concentration finale de 50 g de cellules sèches par litre de suspension. On ajoute ensuite 5 mg de DNase exempte de RNase par litre de suspension.

30 Les cellules microbiennes sont ensuite désintégrées par passage en continu sur des broyeurs industriels de type APV Manton Gaulin à triple effet pour les souches peu résistantes ou sur homogénéiseur à microbilles de verre de

type DYNO MILL pour les cocci et les souches très résistantes. Cette opération est conduite à basse température $\leq 4^{\circ}\text{C}$ au moyen d'un échangeur thermique puissant.

5 Les lysats bactériens obtenus précédemment sont soumis à une première clarification continue à 15 000 g sur séparateur Sharples à $+4^{\circ}\text{C}$ pour éliminer les résidus de broyage et les germes non broyés.

Le culot de centrifugation est éliminé et le surnageant recueilli, il constitue le lysat clarifié.

10 OBTENTION DES PROTEOGLYCANES MEMBRANAIRES DE KLEBSIELLA PNEUMONIAE (PGM-Kp) - ADJUVANTS DES RIBOSOMES

Ces procédés permettant la production à très grande échelle des (PGM-Kp) sont décrits ci-après à partir du lysat bactérien de Klebsiella pneumoniae clarifié sur Sharples obtenu à l'exemple 1.

15 EXEMPLE 2

50 l de surnageant Sharples (lysat bactérien clarifié) de l'exemple 1 obtenu en partant de Klebsiella pneumoniae n° 145 sont placés dans un réacteur sous agitation à 4°C . On ajoute progressivement à cette suspension 1 volume d'une solution à 1 % (p/v) de bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB) puis on laisse au repos pendant quelques minutes.

25 Le précipité d'impuretés (acides nucléiques, protéines, polysaccharides acides, etc.) est éliminé par centrifugation continue sur séparateur Sharples et les surnageants contenant les (PGM-Kp) sont recueillis.

Les (PGM-Kp) sont ensuite purifiés par une étape d'ultrafiltration tangentielle sur un appareil Millipore équipé de membranes coupant à 10 000 d. Cette étape d'ultrafiltration, de dialyse et de concentration permet l'élimination quantitative du CTAB, des sels et des contaminants de faible poids moléculaire.

La suspension concentrée de (PGM-Kp) ainsi obtenue est stérilisée par autoclavage 20 minutes à 120°C puis lyophilisée stérilement.

EXEMPLE 3

5 50 l de surnageant Sharples (lysât bactérien clarifié de l'exemple 1 obtenu en partant de *Klebsiella pneumoniae* n° 145) sont placés dans un réacteur sous agitation à +4°C. On ajoute dans le réacteur 2 500 g d'acide trichloroacétique cristallisé puis on agite jusqu'à dissolution complète.

10 Après un repos de 20 minutes à 4°C, le précipité d'impuretés est éliminé par centrifugation continue sur séparateur Sharples et le surnageant contenant les (PGM-Kp) est recueilli.

15 Le pH de la solution est ensuite remonté à pH 7,8 par addition de NaOH concentrée, puis on procède à une ultrafiltration tangentielle sur membrane coupant à 10 000 d comme pour l'exemple 2.

20 La suspension concentrée de (PGM-Kp) ainsi obtenue est stérilisée par autoclavage 20 minutes à 120°C puis lyophilisée stérilement.

OBTENTION DE LA FRACTION RIBOSOMALE BRUTE

25 Ces procédés ont tous pour principe commun d'entraîner une précipitation spécifique des ribosomes permettant leur séparation par centrifugation continue à faible vitesse et évitant d'avoir recours à l'ultracentrifugation à très grande vitesse qui ne peut s'appliquer qu'à de petits volumes.

30 Les exemples qui suivent ont été mis en oeuvre à partir de lysats bactériens obtenus comme cela est décrit dans l'exemple 1 en partant de la souche bactérienne

appropriée, le surnageant recueilli étant soumis à une ultrafiltration tangentielle sur un système Millipore équipé de membranes coupant 0,22 μ .

5 Le filtrat limpide obtenu contient alors les ribosomes et les substances solubles qui vont être séparés comme cela sera décrit ci-après.

EXEMPLE 4

10 50 l de lysat bactérien ultrafiltré sont placés dans un réacteur à +4°C et additionnés lentement d'une solution 1 M de $MgCl_2$ jusqu'à obtenir une concentration finale de 0,1 M en $MgCl_2$. Le pH est alors porté à 6,0 par HCl dilué et les ribosomes sont laissés en précipitation pendant une heure à 4°C sous agitation très lente.

15 Le précipité est recueilli par centrifugation continue sur Sharples puis remis en solution dans un volume initial de tampon Tris-HCl (10 mM) pH 7,0 contenant $EDTA Na_2$ (5 mM).

Cette solution constitue la fraction ribosomale brute.

20 EXEMPLE 5

50 l de lysat bactérien ultrafiltré sont placés dans un réacteur à +4°C et le pH de la suspension est abaissé progressivement jusqu'à pH 4,0 par addition d'acide acétique (environ 0,5 % du volume).

25 Après 1 heure de repos à +4°C, le précipité de ribosomes bruts est séparé par centrifugation continue sur séparateur Sharples.

30 Le culot est dispersé énergiquement dans un volume initial de tampon Tris-HCl (10 mM) pH 7,5 contenant NaCl (0,15 M) et $EDTA Na_2$ (1 mM) en maintenant à pH constant.

Cette solution constitue la fraction ribosomale brute.

EXEMPLE 6

50 l de lysat bactérien ultrafiltré sont placés dans un réacteur à +4°C sous agitation. On ajoute lentement 5 l d'une solution à 5 % (p/v) de CTAB (bromure de cetyl-triméthylammonium).

Après un repos de quelques minutes, le précipité est recueilli par centrifugation continue sur Sharples.

Le précipité est lavé deux fois par dispersion 30 minutes dans 30 l d'éthanol 70 %, 0,2 M en CH_3COONa , pH 7,0 puis centrifugation sur Sharples.

Le culot lavé est repris dans 30 l de tampon Tris-HCl (10 mM) pH 7,0 contenant MgCl_2 (10 mM) et NaCl (0,15 M). Cette solution constitue la fraction ribosomale brute.

EXEMPLE 7 - OBTENTION DES RIBOSOMES PURIFIES

La suspension ribosomale brute obtenue par l'un des trois procédés décrits précédemment est soumise à une purification comportant les étapes suivantes :

1) Lavage des ribosomes

Les impuretés liées aux ribosomes sont éliminées par lavage au SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) dans les conditions suivantes : 30 l de solution de ribosomes bruts sont placés dans un réacteur sous agitation et la température portée à 20°C. On ajoute à cette solution 75 g de SDS puis on poursuit l'agitation pendant 45 minutes à cette température, le milieu devient rapidement limpide.

2) Précipitation des ribosomes purifiés

A la solution précédente, on ajoute rapidement sous agitation 21 l d'alcool éthylique glacé, puis on laisse au repos 30 minutes à 4°C.

Le précipité de ribosomes purifiés est recueilli par centrifugation continue sur séparateur Sharples et le culot est repris dans 10 l de tampon pH 7,0 glacé contenant MgCl_2 (1 mM) et KCl (0,05 M).

3) Purification par chromatographie d'affinité

Des anticorps monoclonaux sont préparés contre chaque ribosome par hyperimmunisation de la souris avec ces ribosomes et fusion des cellules spléniques immunes de la souris avec des cellules de myélome x 63 selon la technique décrite par Galfre G. et Milstein C. (Methods in Enzymol. 73 B, 3-46 (1981)). Les anticorps monoclonaux ainsi obtenus sont sélectionnés en fonction de leur affinité pour les ribosomes et de leur capacité d'induire une protection passive chez la souris contre une infection homologue.

Un support d'affinité spécifique est alors préparé par couplage covalent de cet anticorps monoclonal sur une matrice de type dextran activée par un procédé classique comme le CNBT par exemple.

Une colonne d'affinité est ainsi préparée permettant l'isolement sélectif des ribosomes immunogéniques selon le protocole décrit ci-dessous :

. Une colonne de 70 mm de diamètre sur 400 mm de hauteur est moulée avec le support d'affinité préparé comme décrit ci-dessus et équilibrée en tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,0 contenant $MgCl_2$ (1 mM) et KCl 0,05 M.

. La solution de ribosomes lavés préparée précédemment est passée sur la colonne pour fixer les ribosomes. La colonne est ensuite lavée par le même tampon jusqu'à ce que l'effluent n'absorbe plus à 280 nm.

. Les ribosomes sont ensuite élués par le même tampon contenant en plus KSCN (2M). Le pic de ribosome détecté par son absorption à 260 nm est recueilli.

4) Ultrafiltration

La fraction ribosomale ainsi purifiée est soumise à une ultrafiltration sur membrane coupant à 100 000 d avec alimentation en tampon pH 7,0 glacé contenant $MgCl_2$ (1 mM) et KCl (0,05 M) pour éliminer totalement le KSCN et concentrer la solution pour avoir environ 10 mg/ml de ribosomes.

EXEMPLE 8 - PREPARATION DU VACCIN RIBOSOMAL

Pour la réalisation du vaccin ribosomal dans sa présentation définitive, on procède dans l'enceinte d'un bloc stérile aux opérations suivantes :

- 5 - décongélation des suspensions ribosomales,
- regroupement dans les proportions de la formule considérée en fonction de leurs titres respectifs en ribosomes,
- addition de la quantité correspondante de
- 10 protéoglycanes membranaires de *Klebsiella pneumoniae* lyophilisés,
- homogénéisation,
- addition des excipients suivant la forme finale considérée,
- répartition en flacons unitaires (ou par multiples de la dose unitaire),
- 15 - lyophilisation stérile,
- bouchage, sertissage;
- contrôles (physico-chimiques, immunologiques, stérilité, toxicité, etc.).

REVENDICATIONS

1) Procédé de préparation de protéoglycanes membranaires de bactéries choisies parmi : Klebsiella, Serratia et Corynebacterium, caractérisé en ce que, à partir d'un lysat clarifié de ladite souche bactérienne,

5 a) on traite le surnageant du lysat clarifié avec le cétyltriméthylammonium ou de l'acide trichloro-acétique, et

b) après traitement on sépare le surnageant contenant les protéoglycanes membranaires purifiés des impuretés précipitées.

10 2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le lysat est obtenu par broyage d'un concentrat bactérien à l'aide de moyens mécaniques et/ou pneumatiques.

15 3) Procédé selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que le lysat est clarifié par centrifugation.

4) Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'après traitement au cétyltriméthylammonium, on sépare le surnageant par centrifugation et on effectue une ultrafiltration pour éliminer le cétyltriméthylammonium, les sels et les contaminants de faible poids moléculaire.

20 5) Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'après traitement à l'acide trichloro-acétique, on sépare le surnageant par centrifugation et on effectue une ultrafiltration, après avoir ramené le pH entre 7 et 8, pour éliminer les sels et les contaminants de faible poids moléculaire.

6) Procédé selon l'une des revendications 4 et 5, caractérisé en ce que l'ultrafiltration est une ultrafiltration tangentielle sur membrane coupant à 10 000 daltons.

30 7) Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la souche bactérienne est une souche de Klebsiella pneumoniae biotype a non capsulé.

8) Protéoglycanes membranaires obtenus par la mise en oeuvre du procédé selon l'une des revendications 1 à 5.

9) Procédé de préparation de fractions ribosomales de souches bactériennes, caractérisé en ce que :

5 a) on traite un lysat clarifié, filtré, de ladite souche par $MgCl_2$, par un acide organique ou par le cétyltriméthylammonium,

b) après traitement, on récupère le précipité qui est éventuellement lavé pour récupérer les ribosomes.

10 10) Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que dans l'étape a), le traitement est effectué jusqu'à une concentration de 0,05 à 0,2 M en $MgCl_2$ à un pH acide et en ce que les ribosomes précipités sont recueillis.

15 11) Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que dans l'étape a), le traitement est effectué par abaissement du pH jusqu'au voisinage de 4 avec de l'acide acétique et en ce que les ribosomes précipités sont recueillis.

20 12) Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que dans l'étape a), le traitement est effectué avec le cétyltriméthylammonium et en ce que dans l'étape b) le précipité est lavé par de l'éthanol.

25 13) Procédé selon l'une des revendications 9 à 12, caractérisé en ce que les ribosomes obtenus à l'étape b) sont lavés avec du dodécylsulfate de sodium puis précipités par de l'éthanol.

14) Procédé selon l'une des revendications 9 à 13, caractérisé en ce que le lysat clarifié est filtré par ultrafiltration sur membrane coupant à 0,22 μm .

30 15) Ribosomes obtenus par la mise en oeuvre du procédé selon l'une des revendications 9 à 14.

16) Vaccins ribosomaux caractérisés en ce qu'ils comportent en association des ribosomes selon la revendication 15 et des protéoglycanes membranaires selon la revendication 8.

17) Vaccins selon la revendication 16, caractérisés en ce que chaque dose unitaire contient :

5	a)	. Ribosomes d' <i>Actinomyces viscosus</i>	3 µg
		. Ribosomes d' <i>Actinomyces naeslundii</i>	2 µg
		. Ribosomes de <i>Veillonella parvula</i>	2 µg
		. Protéoglycanes membranaires de <i>Klebsiella pneumoniae</i> biotype a	15 µg
10	b)	. Ribosomes d' <i>Escherichia coli</i>	3 µg
		. Ribosomes de <i>Salmonella typhimurium</i>	3 µg
		. Ribosomes de <i>Shigella dysenteriae</i>	3 µg
		. Ribosomes de <i>Staphylococcus aureus</i>	3 µg
		. Protéoglycanes membranaires de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	18 µg
15	c)	. Ribosomes de <i>Candida albicans</i> type A	3,5 µg
		. Ribosomes de <i>Candida albicans</i> type B	3,5 µg
		. Protéoglycanes membranaires de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	15,0 µg
	d)	. Ribosomes de <i>Neisseria meningitidis</i> groupe A	3,5 µg
		. Ribosomes de <i>Neisseria meningitidis</i> groupe C	3,5 µg
		. Protéoglycanes membranaires de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	15,0 µg
20	e)	. Ribosomes d' <i>Haemophilus influenzae</i> type a	3,5 µg
		. Ribosomes d' <i>Haemophilus influenzae</i> type b	3,5 µg
		. Protéoglycanes membranaires de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	15,0 µg
	f)	. Ribosomes de <i>Streptococcus pneumoniae</i> type 1	3 µg
25		. Ribosomes de <i>Streptococcus pneumoniae</i> type 2	3 µg
		. Ribosomes de <i>Streptococcus pneumoniae</i> type 4	3 µg
		. Ribosomes de <i>Streptococcus pneumoniae</i> type 19 ...	3 µg
		. Protéoglycanes membranaires de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	20 µg.

	g)	. Ribosomes d <i>Streptococcus pyogen</i> s groupe L	5 µg
		. Ribosomes de <i>Streptococcus pyogenes</i> groupe C	5 µg
		. Ribosomes de <i>Streptococcus suis</i>	5 µg
		. Protéoglycanes membranaires de <i>Klebsiella pneumoniae</i> biotype a	10 µg
5	h)	. Ribosomes de <i>Staphylococcus épidermidis</i>	1,5 µg
		. Ribosomes de <i>Staphylococcus aureus</i> type 7	1,5 µg
		. Ribosomes de <i>Staphylococcus aureus</i>	1,5 µg
		. Protéoglycanes membranaires de <i>Klebsiella pneumoniae</i> biotype a	7,5 µg
10	i)	. Ribosomes de <i>Staphylococcus</i> (souche Méricée)....	3,5 µg
		. Ribosomes de <i>Staphylococcus aureus</i>	3,5 µg
		. Protéoglycanes membranaires de <i>Klebsiella pneumoniae</i> biotype a	15,0 µg
	j)	. Ribosomes de <i>Staphylococcus aureus</i>	5 µg
		. Ribosomes de <i>Staphylococcus uberis</i>	5 µg
		. Ribosomes de <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	5 µg
15		. Protéoglycanes membranaires de <i>Klebsiella pneumoniae</i> biotype a	20 µg

Industrial Methods for Manufacturing Ribosomal Vaccines and
Obtained Ribosomal Vaccines

[Procédés industriels de fabrication de vaccins ribosomaux et
vaccins ribosomaux obtenus]

Lucien Dussourd d'Hinterland et al.

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Washington, D.C.

September 2003

Translated by: Schreiber Translations, Inc.

<u>Country</u>	:	France
<u>Document No.</u>	:	2,596,064
<u>Document Type</u>	:	Patent
<u>Language</u>	:	French
<u>Inventor</u>	:	Lucien Dussourd d'Hinterland et al.
<u>Applicant</u>	:	Pierre Fabre Médicament
<u>IPC</u>	:	C 12 P 21/00, 1/04; A 61 K 39/02, 39/116; C 07 K 15/04, 15/14// (C 12 P 21/00, C 12 R 1:22) (C 12 R 1/15, 1:425).
<u>Application Date</u>	:	March 18 th , 1986
<u>Publication Date</u>	:	September 25 th , 1987
<u>Foreign Language Title</u>	:	Procédés industriels de fabrication de vaccins ribosomaux et vaccins ribosomaux obtenus
<u>English Title</u>	:	Industrial Methods for Manufacturing Ribosomal Vaccines and Obtained Ribosomal Vaccines

The present invention relates to industrial methods for manufacturing ribosomal vaccines and the ribosomal vaccines derived therefrom.

Ribosomal vaccines are vaccines wherein the antigenic fraction is composed of a ribosomal fraction; this antigenic ribosomal fraction must, in general, be adjuvated by a fraction that may also be of microbial origin. In most cases, this involves glycoproteins of membrane origin and/or polysaccharides or lipopolysaccharides of microbial origin.

The applicant's prior patent, No. 7343957 dated December 10th, 1973, described the preparation of antigenic ribosomal fraction-based vaccines adjuvated by a membrane fraction of *Klebsiella pneumoniae*.

The applicant's prior patents No. 7510252 dated April 2nd, 1975 and No. 7624124 dated August 6th, 1976 described vaccines derived from ribosomal vaccines wherein the ribosomal RNA or the ribosomes themselves were associated with homologous and/or heterologous polysaccharide or lipopolysaccharide fractions.

¹ Numbers in the margin indicate pagination in the foreign text.

The applicant's prior patent No. 7835649 dated December 19th, 1978 described the preparation of bacterial membrane proteoglycans that are usable as adjuvants in ribosomal vaccines.

The present invention, developed at the Centre d'Immunologie et de Biologie Pierre Fabre, relates to novel industrial methods for the manufacture of immunogenic microbial ribosomal fractions as well as membrane proteoglycans of nonencapsulated biotype-a *Klebsiella pneumoniae* that are associated with them as adjuvants.

This novel technology enables the development of very large-scale production of this type of vaccines, particularly for veterinary applications such as those cited by way of example.

More specifically, the present invention relates to a method for preparing membrane proteoglycans from bacteria selected from among: *Klebsiella*, *Serratia*, and *Corynebacterium*, wherein, starting from a clarified lysate of said bacterial strain:

a) the supernatant of the clarified lysate is processed with CTAB or trichloroacetic acid, and

b) after processing, the supernatant containing the purified membrane proteoglycans is separated from the precipitated impurities.

Generally speaking, bacterial lysates are obtained by milling a bacterial concentrate using mechanical and/or pneumatic means; these milling means must, of course, be adapted to the type of microbial cells to be disintegrated and more specific information will be provided in the description of the examples.

/3

The bacterial lysates obtained after milling may be clarified using any known technology, but are preferably clarified by centrifugation at 15,000 g, for example, on a separator; this is to eliminate milling residue and unmilled germs.

Depending upon the type of processing performed during step a), we proceed as follows:

- When processing with CTAB is performed, the supernatant is separated by centrifugation and ultracentrifugation is performed in order to eliminate the CTAB itself, salts, and low-molecular-weight contaminants. This is done by using, for example, tangential ultrafiltration with a membrane cutting at 10,000 d;

- when the processing involves processing with trichloroacetic acid, the precipitate of impurities is eliminated by centrifugation, on a separator for example, and the supernatant is ultrafiltered on a membrane cutting at 10,000 d as above, but preferably after bringing the pH up to around 7, to 7.8 for example, by adding a base such as concentrated NaOH.

In both cases, after ultrafiltration, we obtain a concentrated suspension of membrane proteoglycans, which may be sterilized by autoclaving at 120°C, then lyophilized in order to be used at a later date.

Preferably, the adjuvant membrane proteoglycans will be prepared from a nonencapsulated biotype-a mutant strain of *Klebsiella pneumoniae*, recorded in the Collection of the Institut Pasteur in Paris under the number 145-I.IP.

/4

The antigenic ribosomal fraction is preferably prepared as follows:

a) a filtered and clarified lysate of this strain is processed with $MgCl_2$ using an organic acid or CTAB;

b) after processing, the precipitate is recovered; it may be washed in order to recover the ribosomes, if necessary.

The filtered, clarified lysate may be obtained for the clarified lysate as described above for the membrane

proteoglycans; however, the clarified lysate is filtered, preferably using ultrafiltration on a membrane cutting at 0.22 μ in order to eliminate, specifically, the membrane proteoglycans and the various milling residues that may not have been eliminated during centrifugation.

Depending upon the nature of the processing used in step a), we proceed as follows:

- When the processing is performed with $MgCl_2$, we add to the clarified and filtered bacterial lysate a solution of $MgCl_2$, preferably 1 N, until we obtain a final concentration of 0.1 M of $MgCl_2$. The pH is adjusted to an acid pH, on the order of 6 for example, using diluted HCl, and the ribosomes are allowed to precipitate out. This precipitate is then collected using centrifugation, for example.

- When the processing is performed using an organic acid, specifically acetic acid, the acetic acid is added until a pH of 4 is reached, then the ribosome precipitate is allowed to form and it is separated by centrifugation, for example.

- When the processing involves CTAB, we add to the clarified and filtered bacterial lysate a CTAB solution, at 5% for example (w/v), and the precipitate is allowed to form. This precipitate is recovered by centrifugation and may be washed using ethanol, for example.

The product obtained at the end of step b) constitutes an unwashed ribosomal fraction that can be purified by washing with sodium dodecylsulfate, then by precipitation using ethyl alcohol, for example. The obtained precipitate can be subjected to additional purification by immunoaffinity column chromatography of the immobilized monoclonal antibodies that are specific to the vaccinating antigenic determinant linked to the ribosomes. The highly-purified ribosomes obtained in this way may be dialyzed in order to eliminate excess salts, then sterilized before being used in association with the membrane proteoglycans.

The nature of the strains that are processed to obtain the ribosomes depends, of course, on the type of vaccines one wishes to obtain, since these ribosomes constitute the antigenic fraction of the vaccines.

We will provide hereinafter various vaccine formulas that belong more specifically within the scope of the invention. In general, the strains used originate either from pathology samples or microorganism collections; these strains were reactivated in laboratory animals and maintained on appropriate media.

Among the vaccines that may be obtained using the method according to the invention, we must cite more specifically:

1) Parodontopathy vaccine

- Single-dose formula

- | | | |
|----|---|-------|
| a) | - Ribosomes of <i>Actinomyces viscosus</i> | 3 µg |
| | - Ribosomes of <i>Actinomyces naeslundii</i> | 2 µg |
| | - Ribosomes of <i>Veillonella parvula</i> | 2 µg |
| | - Membrane proteoglycans of biotype a
<i>Klebsiella pneumoniae</i> | 15 µg |

/6

2) Intestinal vaccine

- Single-dose formula

- | | | |
|----|--|-------|
| b) | - Ribosomes of <i>Escherichia coli</i> | 3 µg |
| | - Ribosomes of <i>Salmonella typhimurium</i> | 3 µg |
| | - Ribosomes of <i>Shigella dysenteriae</i> | 3 µg |
| | - Ribosomes of <i>Staphylococcus aureus</i> | 3 µg |
| | - Membrane proteoglycans of <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 18 µg |

3) Candidoses vaccine

- Single-dose formula

- | | | |
|----|---|--------|
| c) | - Ribosomes of type A <i>Candida albicans</i> | 3.5 µg |
| | - Ribosomes of type B <i>Candida albicans</i> | 3.5 µg |

- Membrane proteoglycans of Klebsiella

pneumoniae

15.0 µg

4) Meningitis vaccine

- Single-dose formula

d) - Ribosomes of group A Neisseria meningitidis 3.5 µg

- Ribosomes of group C Neisseria meningitidis 3.5 µg

- Membrane proteoglycans of Klebsiella

pneumoniae

15.0 µg

- Single-dose formula

e) - Ribosomes of type a Haemophilus influenzae 3.5 µg

- Ribosomes of type b Haemophilus influenzae 3.5 µg

- Membrane proteoglycans of Klebsiella

pneumoniae

15.0 µg

5) Pneumococcal vaccine

- Single-dose formula

f) - Ribosomes of type 1 Streptococcus pneumoniae 3 µg

- Ribosomes of type 2 Streptococcus pneumoniae 3 µg

- Ribosomes of type 4 Streptococcus pneumoniae 3 µg

- Ribosomes of type 19 Streptococcus pneumoniae 3 µg

- Membrane proteoglycans of Klebsiella

pneumoniae

20 µg.

6) Trivalent streptococcal porcine meningitis vaccine

- Single-dose formula

- g) - Ribosomes of group L Streptococcus pyogenes 5 µg
- Ribosomes of group C Streptococcus pyogenes 5 µg
- Ribosomes of Streptococcus suis 5 µg
- Membrane proteoglycans of biotype a Klebsiella pneumoniae 10 µg

7) Rabbit staphylococcia vaccine

- Trivalent vaccine single-dose formula

- | | | |
|----|--|--------|
| h) | - Ribosomes of <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 1.5 µg |
| | - Ribosomes of type 7 <i>Staphylococcus aureus</i> | 1.5 µg |
| | - Ribosomes of <i>Staphylococcus aureus</i> | 1.5 µg |
| | - Membrane proteoglycans of biotype a <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 7.5 µg |

- Divalent vaccine single-dose formula

- | | | |
|----|---|---------|
| i) | - Ribosomes of Staphylococcus (Mérimeé strain) | 3.5 µg |
| | - Ribosomes of Staphylococcus aureus | 3.5 µg |
| | - Membrane proteoglycans of biotype a Klebsiella pneumoniae | 15.0 µg |

8) Cow mastitis vaccine

- Single-dose formula

cooling to +4°C at the end of the exponential growth phase in order to preserve the integrity of the biological structures.

The biomass is separated from the culture medium by continuous cold centrifugation on commercial separators of the Sharples or Westfalia type.

After washing by replacing them in suspension in sterile physiological serum and centrifugation, the cell concentrates are stored frozen until they are processed.

The bacterial concentrate is thawed in a reactor and suspended in tris-HCl buffer (10 mM), pH 7.0, containing MgCl₂ (0.15 M) at 4°C, resulting in a final concentration of 50 g of dry cells per liter of suspension. We then add 5 mg of RNase-free DNase per liter of suspension.

The microbial cells are then disintegrated by continually passing them through commercial mills of the three-stage APV Manton Gaulin type for low-resistance strains or through a glass bead homogenizer of the DYNOMILL type for highly-resistant cocci and strains. This operation is performed at low temperature, $\leq 4^{\circ}\text{C}$, using a high-power heat exchanger.

/9

The previously-obtained bacterial lysates are subjected to an initial continuous clarification at 15,000 g on a Sharples

separator at +4°C in order to eliminate milling residues and unmilled germs.

The centrifugation pellet is eliminated and the supernatant is collected: it makes up the clarified lysate.

OBTAINING MEMBRANE PROTEOGLYCANS OF KLEBSIELLA PNEUMONIAE (PGM-Kp) - RIBOSOME ADJUVANTS

The methods enabling very large-scale production of (PGM-Kp) are described below starting with the Sharples-clarified *Klebsiella pneumoniae* bacterial lysate obtained in Example 1.

EXAMPLE 2

50 l of Sharples supernatant (clarified bacterial lysate) from Example 1 obtained from *Klebsiella pneumoniae* No. 145 are placed in a reactor, stirring at 4°C. We progressively add to this suspension 1 volume of a 1% solution (w/v) of cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB), then it is allowed to sit for a few minutes.

The precipitate of impurities (nucleic acids, proteins, acid polysaccharides, etc.) is eliminated by continuous centrifugation on a Sharples separator and the supernatants containing the (PGM-Kp) are collected.

The (PGM-Kp) are then purified in a tangential ultrafiltration step using a Millipore apparatus equipped with membranes cutting at 10,000 d. This ultrafiltration, dialysis,

and concentration step enables the quantitative elimination of CTAB, salts, and low-molecular-weight contaminants.

/10

The concentrated suspension of (PGM-Kp) thus obtained is sterilized by autoclaving for 20 minutes at 120°C, then sterilely lyophilized.

EXAMPLE 3

50 l of Sharples supernatant (clarified bacterial lysate from Example 1 obtained from *Klebsiella pneumoniae* No. 145) are placed in a reactor, stirring at +4°C. We add to the reactor 2500 g of crystallized trichloroacetic acid, then stir until it completely dissolves.

After allowing it to sit for 20 minutes at 4°C, the precipitate of impurities is eliminated by continuous centrifugation on a Sharples separator and the supernatant containing the (PGM-Kp) is collected.

The solution's pH is then brought to 7.8 pH by adding concentrated NaOH, then we proceed with tangential ultrafiltration on a membrane cutting at 10,000 d as in Example 2.

The concentrated suspension of (PGM-Kp) thus obtained is sterilized by autoclaving for 20 minutes at 120°C, then sterilely lyophilized.

OBTAINING THE UNWASHED RIBOSOMAL FRACTION

All of these methods follow the common principle of causing a specific precipitation of the ribosomes that allows them to be separated by low-speed continuous centrifugation, thus obviating the need for very high-speed ultracentrifugation, which only applies to small volumes.

The following examples were implemented starting with bacterial lysates obtained as described in Example 1 from the appropriate bacterial strain; the collected supernatant undergoes tangential ultrafiltration on a Millipore system equipped with membranes cutting at 0.22 μ .

/11

The clear filtrate obtained then contains the ribosomes and the soluble substances that will be separated as described below.

EXAMPLE 4

50 l of ultrafiltered bacterial lysate are placed in a reactor at +4°C and a solution of 1 M of $MgCl_2$ is slowly added until a final concentration of 0.1 M of $MgCl_2$ is obtained. The pH is then brought to 6.0 using diluted HCl and the ribosomes are left to precipitate out for one hour at 4°C while being stirred very slowly.

The precipitate is collected by continuous centrifugation on Sharples then placed back into a solution in an initial volume of Tris-HCl buffer (10 mM), pH 7.0, containing EDTA Na₂ (5 mM).

This solution constitutes the unwashed ribosomal fraction.

EXAMPLE 5

50 l of ultrafiltered bacterial lysate are placed in a reactor at +4°C and the pH of the suspension is progressively lowered until it reaches pH 4.0 by adding acetic acid (roughly 0.5% of the volume).

After resting for 1 hour at +4°C, the precipitate of unwashed ribosomes is separated by continuous centrifugation on Sharples separator.

The pellet is energetically dispersed in an initial volume of Tris-HCl buffer (10 mM), pH 7.5, containing NaCl (0.15 M) and EDTA Na₂ (1 mM) while maintaining a constant pH.

This solution constitutes the unwashed ribosomal fraction.

/12

EXAMPLE 6

50 l of ultrafiltered bacterial lysate are placed in a reactor at +4°C while stirring. 5 l of a 5% solution (w/v) of CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide) is slowly added.

After resting for several minutes, the precipitate is collected by continuous centrifugation on Sharples.

The precipitate is washed twice by dispersion [for] 30 minutes in 30 l of 70% ethanol, 0.2 M of CH_3COONa , pH 7.0, then centrifugation on Sharples.

The washed pellet is placed back into 30 l of Tris-HCl buffer (10 mM), pH 7.0, containing MgCl_2 (10 mM) and NaCl (0.15 M).

This solution constitutes the unwashed ribosomal fraction.

EXAMPLE 7 - OBTAINING PURIFIED RIBOSOMES

The unwashed ribosomal suspension obtained by one of the three methods described above undergoes purification including the following steps:

1) Washing of the ribosomes

The impurities connected to the ribosomes are eliminated by washing with SDS (sodium dodecyl sulfate) under the following conditions: 30 l of a solution of unwashed ribosomes are placed in a reactor while stirring and the temperature is brought to 20°C. To this solution is added 75 g of SDS, then stirring is continued for 45 minutes at this temperature; the medium quickly becomes clear.

2) Precipitation of the purified ribosomes

To the preceding solution, we quickly add while stirring 21 l of iced ethyl alcohol, then it is allowed to sit for 30 minutes at 4°C.

The precipitate of purified ribosomes is collected using continuous centrifugation on Sharples separator and the pellet is placed in 10 l of iced pH 7.0 buffer containing MgCl_2 (1 mM) and KCl (0.05 M).

/13

3) Purification by affinity chromatography

Monoclonal antibodies are prepared against each ribosome by hyperimmunizing the mouse with these ribosomes and by fusing immune spleen cells from the mouse with x 63 myeloma cells using the technique described by G. Galfre and C. Milstein (Methods in Enzymol. 73 B, pp. 3-46 (1981)). The monoclonal antibodies thus obtained are selected based on their affinity with the ribosomes and their ability to induce passive protection in the mouse against a homologous infection.

A specific affinity support is then prepared by covalent coupling of this monoclonal antibody on a dextran-type matrix activated by a traditional method such as CNBt, for example.

An affinity column is thus prepared that enables selective isolation of the immunogenic ribosomes according to the protocol described below:

- a column 70 mm in diameter and 400 mm high is molded with the affinity support prepared as described above and balanced in 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0, containing MgCl_2 (1 mM) and KCl (0.05 M).

- The previously-prepared solution of washed ribosomes is passed onto the column in order to set the ribosomes. The column is then washed by the same buffer until the effluent no longer absorbs at 280 nm.

- The ribosomes are then eluted by the same buffer also containing KSCN (2 M). The ribosome peak detected by its absorption at 260 nm is collected.

4) Ultrafiltration

The purified ribosomal fraction undergoes ultrafiltration on membrane cutting at 100,000 d with supply of iced, 7.0 pH buffer containing MgCl_2 (1 mM) and KCl (0.05 M) in order to fully eliminate the KSCN and to concentrate the solution in order to yield roughly 10 mg/ml of ribosomes.

/14

EXAMPLE 8 - PREPARATION OF THE RIBOSOMAL VACCINE

To make the ribosomal vaccine in its definitive form, the following operations are performed in a closed, sterile area:

- thawing of the ribosomal suspensions,

- grouping [of the suspensions] in the proportions of the formula under consideration depending upon their respective ribosome strengths,

- adding the corresponding quantity of lyophilized membrane proteoglycans of *Klebsiella pneumoniae*,

- homogenizing,

- adding excipients according to the final form being considered,

- distribution into single-dose containers (or by multiples of the single dose amount),

- sterile lyophilization,

- capping, crimping,

- testing (physico-chemical, immunological, sterility, toxicity, etc.).

/15

CLAIMS

1) Method for preparing membrane proteoglycans from bacteria selected from among: *Klebsiella*, *Serratia*, and *Corynebacterium*, wherein, starting with a clarified lysate of the bacterial strain,

a) the clarified lysate supernatant is processed with cetyl trimethyl ammonium or trichloroacetic acid, and

b) after processing, the supernatant containing the purified membrane proteoglycans is separated from the precipitated impurities.

2) Method according to Claim 1, wherein the lysate is obtained by milling a bacterial concentrate using mechanical and/or pneumatic means.

3) Method according to either of claims 1 or 2, wherein the lysate is clarified by centrifugation.

4) Method according to one of claims 1 through 3, wherein, after processing with cetyl trimethyl ammonium, the supernatant is separated by centrifugation and ultrafiltration is performed in order to eliminate the cetyl trimethyl ammonium, salts, and low-molecular-weight contaminants.

5) Method according to one of claims 1 through 3, wherein, after processing with trichloroacetic acid, the supernatant is separated by centrifugation and ultrafiltration is performed, after bringing the pH to between 7 and 8, in order to eliminate the salts and low-molecular-weight contaminants.

6) Method according to one of claims 4 or 5, wherein the ultrafiltration is a tangential ultrafiltration on a membrane cutting at 10,000 daltons.

7) Method according to one of claims 1 through 6, wherein the bacterial strain is a strain of unencapsulated biotype a *Klebsiella pneumoniae*.

/16

8) Membrane proteoglycans obtained by implementing the method according to one of claims 1 through 5.

9) Method for preparing ribosomal fractions from bacterial strains, wherein:

a) a filtered, clarified lysate of the strain is processed using $MgCl_2$, an organic acid, or cetyl trimethyl ammonium,

b) after processing, the precipitate is recovered; it may be washed in order to recover the ribosomes.

10) Method according to Claim 9, wherein, in step a), processing is performed until a concentration of 0.05 to 0.2 M of $MgCl_2$ at an acid pH is obtained and wherein the precipitated ribosomes are collected.

11) Method according to Claim 9, wherein, in step a), processing is performed by lowering the pH to roughly 4 using acetic acid and wherein the precipitated ribosomes are collected.

12) Method according to Claim 9, wherein, in step a), processing is performed using cetyl trimethyl ammonium and wherein, in step b), the precipitate is washed using ethanol.

13) Method according to one of claims 9 through 12, wherein the ribosomes obtained in step b) are washed using sodium dodecylsulfate, then precipitated using ethanol.

14) Method according to one of claims 9 through 13, wherein the clarified lysate is filtered by ultrafiltration on membrane cutting at 0.22 μ m.

15) Ribosomes obtained by the implementation of the method according to one of claims 9 through 14.

16) Ribosomal vaccines wherein they include, in association, ribosomes according to Claim 15 and membrane proteoglycans according to Claim 8.

/17

17) Vaccines according to Claim 16, wherein each single-dose amount contains:

- | | | |
|----|--|------------|
| a) | - Ribosomes of <i>Actinomyces viscosus</i> | 3 μ g |
| | - Ribosomes of <i>Actinomyces naeslundii</i> | 2 μ g |
| | - Ribosomes of <i>Veillonella parvula</i> | 2 μ g |
| | - Membrane proteoglycans of biotype a | |
| | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 15 μ g |
| b) | - Ribosomes of <i>Escherichia coli</i> | 3 μ g |
| | - Ribosomes of <i>Salmonella typhimurium</i> | 3 μ g |
| | - Ribosomes of <i>Shigella dysenteriae</i> | 3 μ g |
| | - Ribosomes of <i>Staphylococcus aureus</i> | 3 μ g |

- Membrane proteoglycans of *Klebsiella pneumoniae* 18 µg
- c) - Ribosomes of type A *Candida albicans* 3.5 µg
- Ribosomes of type B *Candida albicans* 3.5 µg
- Membrane proteoglycans of *Klebsiella pneumoniae* 15.0 µg
- d) - Ribosomes of group A *Neisseria meningitidis* 3.5 µg
- Ribosomes of group C *Neisseria meningitidis* 3.5 µg
- Membrane proteoglycans of *Klebsiella pneumoniae* 15.0 µg
- e) - Ribosomes of type a *Haemophilus influenzae* 3.5 µg
- Ribosomes of type b *Haemophilus influenzae* 3.5 µg
- Membrane proteoglycans of *Klebsiella pneumoniae* 15.0 µg
- f) - Ribosomes of type 1 *Streptococcus pneumoniae* 3 µg
- Ribosomes of type 2 *Streptococcus pneumoniae* 3 µg
- Ribosomes of type 4 *Streptococcus pneumoniae* 3 µg
- Ribosomes of type 19 *Streptococcus pneumoniae* 3 µg
- Membrane proteoglycans of *Klebsiella pneumoniae* 20 µg.
- g) - Ribosomes of group L *Streptococcus pyogenes* 5 µg
- Ribosomes of group C *Streptococcus pyogenes* 5 µg

/18

	- Ribosomes of <i>Streptococcus suis</i>	5 µg
	- Membrane proteoglycans of biotype a <i>Klebsiella pneumoniae</i>	10 µg
h)	- Ribosomes of <i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.5 µg
	- Ribosomes of type 7 <i>Staphylococcus aureus</i>	1.5 µg
	- Ribosomes of <i>Staphylococcus aureus</i>	1.5 µg
	- Membrane proteoglycans of biotype a <i>Klebsiella pneumoniae</i>	7.5 µg
i)	- Ribosomes of <i>Staphylococcus</i> (Mérimeé strain)	3.5 µg
	- Ribosomes of <i>Staphylococcus aureus</i>	3.5 µg
	- Membrane proteoglycans of biotype a <i>Klebsiella pneumoniae</i>	15.0 µg
j)	- Ribosomes of <i>Staphylococcus aureus</i>	5 µg
	- Ribosomes of <i>Staphylococcus uberis</i>	5 µg
	- Ribosomes of <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	5 µg
	- Membrane proteoglycans of biotype a <i>Klebsiella pneumoniae</i>	20 µg